

神经组织解离试剂盒 (T) (92-01-0093)

[组分]

神经组织解离试剂盒 (T)

6 瓶, 包含

10 mL 酶 T

2×50 mL 缓冲液 X (无菌)

1.5 mL 缓冲液 Y (无菌)

1 瓶酶 A (冻干粉末)

1 mL 缓冲液 A

[规格] 50 次消化 (2 mL 的体系)。

[储存条件] 到货后将神经组织解离试剂盒(T)中的酶 T 等分存放在 -20 °C 下。所有其他成分到货后请保存在 2-8 °C。有效期标注在包装盒标签上。有关冻干成分溶解和溶解后储存的信息, 请参阅第一节。

[原理]

通过将机械解离与细胞外基质的酶解相结合, 可将新生儿大脑 (动物年龄小于等于 P7) 的神经组织解离成单细胞悬浮液, 从而保持组织结构的完整性。

使用试剂盒组件对神经组织进行酶解, 而机械解离步骤则使用组织解离器。细胞应立即进行处理, 以用于下游应用, 如细胞分离、细胞培养、细胞或分子分析。

[背景信息]

神经组织解离试剂盒 (NTDK) 设计用于从新生儿大脑 (\leq P7) 的神经组织中温和、快速、高效地生成单细胞悬液。组织解离器提供了从各种神经组织中获得单细胞悬浮液的优化程序, 结合使用组织解离器, 它们可以在封闭的无菌系统中自动进行组织解离。

[试剂和仪器要求]

- 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) (Sigma-Aldrich # 55021C), 以下简称 HBSS (w/o)
- 含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 HBSS (Sigma-Aldrich # 55037C), 以下简称 HBSS (w)。
- 50 mL 管
- 过滤器 (70 μm)
- 样品混悬仪与 37°C 培养箱结合使用
- 组织解离器, 自动组织解离器, 带有加热模块的组织解离器
- 可选) MACS 神经培养基
- 可选) NeuroBrew-21
- 可选) ART® 1000 REACH™ 移液器吸头

[步骤]

一、试剂准备

▲ 下面给出的是最多 400 毫克起始组织材料的体积。如果处理的组织材料少于 400 毫克，请使用与所示相同的体积。当处理量超过 400 毫克时，请相应增加所有试剂体积和总体积。每个 C 管最多可处理 1600 毫克小鼠大脑。

1. 酶 T 已准备就绪。准备适当体积的等分样品，避免反复冻融。将等分样品保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。该溶液可稳定保存 6 个月。用 1mL 缓冲液 A 重悬标有酶 A 的小瓶中的冻干粉末。然后将此溶液等分并保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下，以备后用。避免反复冻融。

2. 根据下表配制酶混合物 1 和酶混合物 2。

	酶混合液 1		酶混合液 2	
NTDK (T)	酶 T 200 μL	缓冲液 X 1750 μL	缓冲液 Y 20 μL	酶 A 10 μL

二、神经组织解离步骤

▲ 对于组织解离后的细胞培养实验，所有步骤都应在无菌条件下进行。

▲ 本方案描述的是小鼠脑组织的解离，但原则上也可用于其他类型的神经组织。

全自动可加热式组织解离器解离

1. 取出小鼠大脑。测定 1mL HBSS (w/o) 中组织的重量。
2. 将最多 400 毫克组织所需的 1950 μL 酶混合物 1 (参见第一节中的表格) 转移到 C 管中。
3. 将小鼠脑转移到装有酶混合液 1 的 C 管中。
4. 将 30 μL 酶混合液 2 (参见第一节中的表格) 移入 C 管中。
5. 紧闭 C 管，将其倒扣在带加热器的自动组织解离器的套管上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于旋转器/定子的区域内。

6. 运行解离程序 37C_NTDK_1，继续“组织解离器或全自动组织解离器解离”的第 14 步。

组织解离器或全自动组织解离器解离

1. 取出小鼠大脑。测定 1mL HBSS (w/o) 中组织的重量。
2. 将最多 400 毫克组织所需的 1950 μ L 酶混合物 1 (参见第一节中的表格) 移入 C 管中，在 37°C 下预热 10-15 分钟。
3. 将小鼠脑转移到装有预热混合酶 1 的 C 管中。
4. 紧闭 C 管并将其倒扣在解离器的套管上。

▲ 注意：必须确保样品材料位于旋转器/定子的区域内。

5. 运行解离程序 m_brain_01。
6. 使用样品混悬仪在 37°C 温度下连续缓慢旋转，孵育样品 15 分钟。
7. 将 C 管倒扣在组织解离器的套管上。
8. 运行解离程序 m_brain_02。
9. 将 30 μ L 酶混合液 2 (参见第一节中的表格) 移入 C 管。轻轻倒置混合。不要涡旋。

▲ 注：可通过 C 管盖中央的隔膜密封开口移液，将酶混合物加入封闭的 C 管中。使用 10-200 μ L 移液器吸头。

10. 使用样品混悬仪在 37°C 下缓慢、持续旋转，将样品孵育 10 分钟。
11. 将 C 管倒插在组织解离器的套管上。
12. 运行解离程序 m_brain_03。
13. 使用样品混悬仪在 37°C 下缓慢持续旋转，孵育样品 10 分钟。
14. 程序结束后，将 C 管从组织解离器中取出。

15. 短暂离心，收集离心管底部的样品。

16. 重新悬浮样品，并将细胞悬浮液转移至放置在 50 mL 离心管上的滤网（70 μm ）。

▲ 注：使用前用缓冲液湿润滤网。

▲ 注意：在增加试剂量和总体积时，也要增加滤网（70 μm ）的数量。一个滤网（70 μm ）最多可用于 2 mL。

▲ 注意：可通过 C 管盖中央的隔膜密封开口移液，从封闭的 C 管中取出离体组织。使用 ART1000 REACH1000 μL 移液器吸头。

▲ 注意：直径大于 70 μm 的细胞可能会丢失。要在过滤中获得这些细胞，请使用网眼大小合适的细胞过滤器。

17. 通过滤网（70 μm ）加入 10 mL HBSS (w) 。

▲ 注：当处理超过 400 毫克小鼠大脑时，用适量的 HBSS (w)（酶溶液体积的五倍）清洗滤网（70 μm ）。如有必要，可分割样品。

18. 丢弃滤网（70 μm ），室温下以 300 \times g 离心细胞悬浮液 10 分钟。完全去除上清液。

19. 用缓冲液重悬细胞至进一步应用所需的体积。

▲ 注：如果在任一洗涤步骤后出现细胞颗粒不均匀的问题，则每毫升细胞悬浮液再加入 30 μL 酶混合物 2。轻轻混合，并使用样品混悬仪在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢连续旋转孵育至少 5 分钟。

20. 应立即处理细胞，以便进一步应用。